

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2001年 2月 5日

出 願 番 号
Application Number:

特願2001-028828

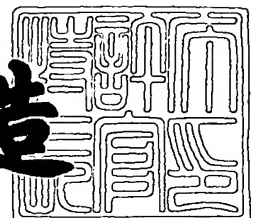
出 願 人
Applicant(s):

国際試薬株式会社

2001年12月21日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3110809

【書類名】 特許願
【整理番号】 NP00-1181
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 37/54
C07K 33/573

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 - 2
国際試薬株式会社 研究開発センター内

【氏名】 菊川 紀弘

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 - 2
国際試薬株式会社 研究開発センター内

【氏名】 奥田 昌宏

【特許出願人】

【識別番号】 000170565

【氏名又は名称】 国際試薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【選任した代理人】

【識別番号】 100107939

【弁理士】

【氏名又は名称】 大島 由美子

【電話番号】 03-3864-6538

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013052

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トロンボプラスチン試薬およびその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 トロンボプラスチン試薬の製造工程において、1.0 より大きい国際感度指数 (ISI) を示すトロンボプラスチン含有組成物の ISI を 1.0 に近づける機能を有するアミノ酸またはその誘導体を有効量添加する工程を含むことを特徴とするトロンボプラスチン試薬の製造方法。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のアミノ酸またはその誘導体の有効量として、終濃度が 0.01~10 W/V % になるように添加することを特徴とする請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】 請求項 1 に記載のアミノ酸またはその誘導体が、グルタミン酸またはグルタミン酸ナトリウムであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】 アミノ酸またはその誘導体を添加する工程が、原料組成物からトロンボプラスチンを抽出する工程後凍結乾燥前であることを特徴とする請求項 1~3 のいずれか 1 に記載の製造方法。

【請求項 5】 アミノ酸またはその誘導体を添加する工程が、原料組成物からトロンボプラスチンを抽出し、凍結乾燥した後であることを特徴とする請求項 1~3 のいずれか 1 に記載の製造方法。

【請求項 6】 請求項 1~5 のいずれか 1 の方法で製造されたトロンボプラスチン試薬。

【請求項 7】 1.0 より大きい国際感度指数 (ISI) を示すトロンボプラスチン含有組成物の ISI を 1.0 に近づける機能を有するアミノ酸またはその誘導体を有効量含有することを特徴とするトロンボプラスチン試薬。

【請求項 8】 アミノ酸またはその誘導体の有効量として、終濃度が 0.01~10 W/V % になるように添加することを特徴とする請求項 7 に記載のトロンボプラスチン試薬。

【請求項 9】 アミノ酸またはその誘導体がグルタミン酸またはグルタミン酸ナトリウムであることを特徴とする請求項 7 または 8 に記載のトロンボプラスチン試薬。

ン試薬。

【請求項 1 0】請求項 6 ～ 9 のいずれか 1 に記載のトロンボプラスチン試薬を含む凝固時間測定試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明が属する技術分野】

本発明は、凝固因子測定に使用されるトロンボプラスチン試薬であって、測定感受性の高い新規な試薬の提供およびその製造方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

患者血液中における凝固因子の欠損をスクリーニングする試験として Q u i c k のトロンボプラスチン時間 (P T) が使用されている。 P T はまた、経口抗凝固剤による治療のモニターにも用いられる。この P T の測定は、トロンボプラスチン試薬の性能によって異なるが、正常血液ドナーの P T は 1 0 ～ 1 4 秒を示し、凝固因子欠損血漿の P T は、凝固因子の欠損の程度に応じて延長するように調製されたトロンボプラスチン試薬を用いるのが好ましい。

【0 0 0 3】

活性なトロンボプラスチンは血漿中で凝固を誘導し、脂質成分とタンパク質成分から構成される。タンパク質すなわち組織因子は膜に結合し、多くの様々な組織に見出される。タンパク質と脂質の間の結合は疎水性相互作用に基づき $C a^{2+}$ 非依存性である。タンパク質残基は分子量 4 3 ～ 5 3 kDa を有する糖タンパク質からなる。組織因子の 1 分子は凝固 V I I 因子または凝固 V I I a 因子の 1 分子に結合することができる。凝固 V I I 因子／凝固 V I I a 因子の組織因子への結合は $C a^{2+}$ 依存性である。脂質、組織因子および凝固 V I I a 因子からなる複合体は凝固 X 因子を切断して凝固 X a 因子を形成し、それによって最終的に活性化プロトロンビンによる血液凝固を誘発する。

トロンボプラスチン試薬の添加後 1 0 ～ 1 4 秒での血漿中における凝固の開始は、凝固系が無傷であることを指示する。凝固時間の増大は、ある障害を示す。障害は 1 種または 2 種以上の凝固因子の濃度が低すぎる結果として起こる。

【0004】

トロンボプラスチンは種々の動物性原料の多種類の組織から抽出することができる。これらの原料の限られる入手性、それらの価格等のために普遍的に利用される原料が限られているが、最も一般的な原料であるウサギの脳から誘導されるトロンボプラスチンは典型的にはヒト組織から誘導される、トロンボプラスチンと比べて相対的に低い感度を有する。トロンボプラスチンの原料、抽出方法、および試薬の組成が試薬感度を定める際の重要な要素となる。そこで、トロンボプラスチンの感度を向上させるために硫酸バリウム、非イオン性界面活性剤を用いて抽出する等の検討が試みられ、報告されている（特表平3-503534公報）。

【0005】

他の感度向上の方法として、少量のタンパク質を特異的に除去する方法が報告されている。様々な起源のトロンボプラスチン試薬は、特定の因子の欠損を指示するそれらの感度において異なることが多い。これは、測定すべき因子の少量が試薬中に持ち込まれることによる場合がある。

例えば、トロンボプラスチン試薬に残留する凝固VII因子／凝固VIIa因子を選択的に阻害することによる感度向上の方法についても報告されている（特開平10-330400公報）。

【0006】

より正確な凝固時間測定のために、PT測定の標準化が行われている。そのために、トロンボプラスチン試薬の標準品を設定し、これを基本として各試薬の感度を国際感度指数（International Sensitivity Index, 以下「ISI」と略す。）で表示し、各試薬に記載される。

【0007】

トロンボプラスチン試薬を用いてPTを測定した場合に、正常人血漿のPTと凝固因子欠乏血漿のPTを測定したときのPTの差が大きくなるほどISI値は低くなり、差が少ないほどISI値は高くなる。従って、測定感度の良いトロンボプラスチン試薬のISI値は低いものであり、このような試薬が望まれている。トロンボプラスチンの国際標準品のISI値は、1.0である。

【0008】

しかし、トロンボプラスチン試薬は、その原料組成物により性状が異なることは上述したとおりであるが、例えばヒト、ウサギまたはウシ由来の原料により、その性状は異なり、1.0より大きいISI値を示すトロンボプラスチン含有組成物となる場合が多い。

【0009】

さらに、トロンボプラスチン試薬の製造工程における凍結乾燥処理工程が凝固時間測定に影響を及ぼす場合がある。すなわち、該凍結乾燥処理したトロンボプラスチン試薬を用いてPTを測定した場合に、正常血漿の場合でも14秒を超える値を示す場合があり、このような現象を凍乾落ちという。正常血漿で14秒以上の値を示すトロンボプラスチン試薬の使用は、測定の効率からも望ましくなく、凍乾落ちを排除できるような製法の開発も望まれている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、測定感受性が大きい新規なトロンボプラスチン試薬を提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ISI値に着目し、鋭意検討を行った結果、ISI値が1.0より大きい値のトロンボプラスチン組成物にアミノ酸またはアミノ酸誘導体を添加すると、ISI値を1.0に近づける場合があることを見出した。このような機能を有するアミノ酸またはアミノ酸誘導体をトロンボプラスチン試薬において有効量添加することにより、本発明を完成した。さらに、該アミノ酸またはアミノ酸誘導体の添加時期についても検討した結果、凍結乾燥による活性低下のない、安定なトロンボプラスチン試薬を提供することができることを見出し、本発明を完成した。

【0012】

すなわち本発明は、

1. トロンボプラスチン試薬の製造工程において、1.0より大きい国際感度指数（ISI）を示すトロンボプラスチン含有組成物のISIを1.0に近づける

機能を有するアミノ酸またはその誘導体を有効量添加する工程を含むことを特徴とするトロンボプラスチン試薬の製造方法、

2. 前項1に記載のアミノ酸またはその誘導体の有効量として、終濃度が0.01～10 W/V %になるように添加することを特徴とする前項1に記載の製造方法、

3. 前項1に記載のアミノ酸またはその誘導体が、グルタミン酸またはグルタミン酸ナトリウムであることを特徴とする前項1または2に記載の製造方法、

4. アミノ酸またはその誘導体を添加する工程が、原料組成物からトロンボプラスチンを抽出する工程後凍結乾燥前であることを特徴とする前項1～3のいずれか1に記載の製造方法、

5. アミノ酸またはその誘導体を添加する工程が、原料組成物からトロンボプラスチンを抽出し、凍結乾燥した後であることを特徴とする前項1～3のいずれか1に記載の製造方法、

6. 前項1～5のいずれか1の方法で製造されたトロンボプラスチン試薬、

7. 1.0より大きい国際感度指数（ISI）を示すトロンボプラスチン含有組成物のISIを1.0に近づける機能を有するアミノ酸またはその誘導体を有効量含有することを特徴とするトロンボプラスチン試薬、

8. 前項7に記載のアミノ酸またはその誘導体の有効量として、終濃度が0.01～10 W/V %になるように添加することを特徴とする前項7に記載のトロンボプラスチン試薬、

9. 前項7に記載のアミノ酸またはその誘導体がグルタミン酸またはグルタミン酸ナトリウムであることを特徴とする前項7または8に記載のトロンボプラスチン試薬、

10. 前項6～9のいずれか1に記載のトロンボプラスチン試薬を含む凝固時間測定試薬キット、
からなる。

【0013】

【発明の実施の形態】

P.Tの新しい記載法としてINR（International Normalized Ratio）が用いられる。INR値はプロトロンビン比（PR）のISI乗で求められ、正常値は

1. 0である。ここで、プロトロンビン比とは、正常人血漿のPTに対する被検試料のPTをプロトロンビン比といい、PRであらわす。

INRとISIの関係は次式で表される。

【0014】

$$INR = PR^{ISI} = (\text{試料血漿のPT} / \text{正常人血漿のPT})^{ISI}$$

【0015】

すなわち、トロンボプラスチン試薬においてISI値が大きい値を示すということは、正常人血漿のPTと凝固因子が欠乏した血漿のPTの差異が少ない試薬であることを示し、ISI値が低い値を示すということは、正常人血漿のPTと、凝固因子が欠乏した血漿のPTの差異が大きい試薬であるといえることができる。そうすると、含有されている凝固因子の量に依存してPTが変化するほうが、感度良く凝固因子の量を測定できると判断される。

【0016】

現在、ヒト胎盤由来、ウサギ脳由来、ウシ脳由来等の各種トロンボプラスチン含有組成物が、トロンボプラスチン試薬の原料バルクとして使用されているが、それらの組成物のほとんどが1.0より大きいISIを示すものである。そこで、ISIを1.0に近づけることにより、感度の良いトロンボプラスチン試薬を提供することができる。この考えは、天然物由来のトロンボプラスチン試薬に限定されるものではなく、遺伝子組換え技術によりつくられたトロンボプラスチン試薬にも応用される。本発明において、トロンボプラスチン含有組成物とは、トロンボプラスチンを含有するものであれば良く、その由来は限定されない。例えば、ヒト胎盤由来、ウサギ脳由来、ウシ脳由来等の天然物由来のもの他、遺伝子組換え技術等によりつくられたトロンボプラスチン含有組成物も含まれる。

【0017】

1.0より大きいISIを示すトロンボプラスチン含有組成物のISIを1.0に近づける機能を有するアミノ酸またはその誘導体とは、トロンボプラスチンの組成物に対して、適当量添加したときに、ISI値を低下させ、1.0に近づける機能を有する物質であって、アミノ酸またはその誘導体を意味する。このような機能を有するアミノ酸またはその誘導体の例として、アラニン、アミノプチ

リックアシッド（以下「ABA」という。）、グルタミン、グルタミン酸ナトリウム、メチオニン、プロリン、セリン、チロシン等があげられる。好ましくは、アラニン、アミノブチリックアシッド（以下「ABA」という。）、グルタミン酸ナトリウムであり、さらに好ましくはグルタミン酸ナトリウムが挙げられる。

【0018】

上記機能を有するアミノ酸またはその誘導体の有効量とは、ISI値を低下させ、1.0に近づける機能を発揮する量であれば特に限定されないが、例えばトロンボプラスチン試薬の最終濃度として、0.01-10w/v%、好適には0.1-5w/v%、より好適には0.5-3w/v%の範囲が挙げられる。

【0019】

上記機能を有するアミノ酸またはその誘導体は、製造工程のいずれの時期に添加しても良く特に限定されない。また、試薬組成物として調製した後に、上記有効量添加することも可能である。特にいわゆる凍結乾燥による活性低下を防ぐ目的で上記機能を有するアミノ酸またはその誘導体を添加する場合には、製造工程のうち凍結乾燥前に添加することが好ましい。

【0020】

本発明のトロンボプラスチン試薬は凍結乾燥品の他、液状品、凍結品であっても良い。

【0021】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0022】

【実施例1】

特開平5-60762公報に記載の方法に基づき調製されたトロンボプラスチンバルク溶液（ウサギ脳由来）に、各種アミノ酸またはアミノ酸誘導体を各濃度添加した場合のPTを測定し、あらかじめINRが規定されている補正血漿をもとに各試料についてのISI値を求めた。

PTの測定は、公知の測定方法に従って行った。

具体的には、以下の方法で測定した。各種アミノ酸またはアミノ酸誘導体を最終濃度が各々1, 2, 3w/v%となるようにトロンボプラスチンバルク溶液に添加し、これに終濃度10mMとなるようにカルシウム塩を加え凍結乾燥したものをトロンボプラスチン試料とした。補正血漿0.05mLを分取し、約1分間37℃で加温した。これに、予め精製水で再溶解し37℃に加温された濃度10mMのカルシウムを混入したトロンボプラスチン試料液0.1mLを加えて自動測定装置コアグレックス700（島津製作所社製）によってPTを測定した。

【0023】

補正血漿のINR値およびPT測定値から、各トロンボプラスチン試料液のISI値を換算して求め、各種添加物のISIに及ぼす効果を調べた。

【0024】

その結果を表1に示した。

その結果、補正血漿（AK-A）については、アミノ酸またはその誘導体を添加したトロンボプラスチン試料を用いた場合には、いずれについても無添加のトロンボプラスチン試料を用いた場合に比べ、PTが短縮した。このことは、トロンボプラスチンバルク試料に各種添加物を加えることで、いわゆる凍結乾燥による活性低下を防ぎ、安定性の高い試薬を提供することが可能と考えられた。

【0025】

また、補正血漿（AK-D）については、1%アラニンを添加した場合を除き、PTは延長した。このことは、補正血漿（AK-A～D）に含まれる凝固因子の含有量の低下に依存してPTが延長し、より感度の良い測定が可能となることが示唆された。

【0026】

各トロンボプラスチン試料のISI値はいずれも無添加のトロンボプラスチンのISI値より小さくなった。

【0027】

【表 1】

各種添加剤を添加した場合のプロトロンビン時間(PT)およびISI値
(PT:秒)

	INR	添加ナシ	1%Glu・Na	2%Glu・Na	3%Glu・Na
AK-A	1.04	14.3	13.6	13.5	13.9
AK-B	1.92	20.4	20.8	21.7	23.4
AK-C	3.07	27.1	28.4	30.1	33.5
AK-D	4.37	33.3	35.8	37.6	41.5
ISI=		1.69	1.48	1.4	1.3

	INR	添加ナシ	1%Ala	2%Ala	3%Ala
AK-A	1.04	14.3	13.5	13.9	13.6
AK-B	1.92	20.4	19.9	20.9	20.6
AK-C	3.07	27.1	27.1	28.2	28.3
AK-D	4.37	33.3	33.1	34.8	35.3
ISI=		1.69	1.59	1.56	1.5

	INR	添加ナシ	1%ABA	2%ABA	3%ABA
AK-A	1.04	14.3	13.5	13.6	13.5
AK-B	1.92	20.4	20.3	20.9	21.0
AK-C	3.07	27.1	27.4	27.8	28.4
AK-D	4.37	33.3	34.2	34.6	35.3
ISI=		1.69	1.54	1.54	1.49

AK-A,B,C,Dは各々補正血漿であり、固有のINR値を示す。
各試料のISI値は、各試料についてのPT測定値および
補正血漿INR値から換算したものである。

【0028】

【実施例 2】

トロンボプラスチンバルク溶液への添加物としてグルタミン酸ナトリウムを最終濃度が各々1, 2, 3, 4, 5w/v%各濃度添加した場合のPTを測定し、ISI値を求めた。

PTの測定およびISI値の換算は、実施例1と同様に行った。

その結果を表2に示した。

【0029】

【表2】

各濃度のグルタミン酸Naを添加した場合のプロトロンビン時間(PT)およびISI値 (PT:秒)							
	INR	添加ナシ	1%Glu・Na	2%Glu・Na	3%Glu・Na	4%Glu・Na	5%Glu・Na
AK-A	1.04	14.7	14.3	14.0	14.0	14.8	15.5
AK-B	1.92	20.5	21.6	22.4	24.7	25.9	28.7
AK-C	3.07	28.0	30.2	31.5	35.5	38.8	41.8
AK-D	4.37	35.2	38.6	41.2	46.4	50.4	57.5
ISI=		1.64	1.44	1.33	1.2	1.16	1.1

AK-A,B,C,Dは各々補正血漿であり、固有のINR値を示す。
各試料のISI値は、各試料についてのPT測定値および補正血漿INR値から換算したものである。

【0030】

各トロンボプラスチン試料のISI値は、グルタミン酸ナトリウムの濃度依存

的に小さくなり、各トロンボプラスチン試料の感度の向上がみとめられた。

【0031】

一方、補正血漿（AK-A）のPTは、2w/v%または3w/v%のグルタミン酸ナトリウムを添加した場合に最も短くなり、安定性の高いトロンボプラスチン試薬が得られた。

【0032】

【発明の効果】

以上説明したように、トロンボプラスチン試薬の製造工程において、1.0より大きい国際感度指数（ISI）を示すトロンボプラスチン含有組成物のISIを1.0に近づける機能を有するアミノ酸またはその誘導体を有効量添加する工程を含むことにより、測定感受性が高く、安定性の高いトロンボプラスチン試薬を提供することが可能となった。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 測定感受性が高い、新規なトロンボプラスチン試薬を提供することである。

【解決手段】 1. 0より大きい国際感度指数（ISI）を示すトロンボプラスチン含有組成物のISIを1. 0に近づける機能を有するアミノ酸またはその誘導体を有効量添加することにより、測定感受性が高いトロンボプラスチン試薬を提供する。具体的には、グルタミン酸ナトリウムを有効量添加する。

特2001-028828

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-028828
受付番号	50100160672
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成13年 2月 6日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成13年 2月 5日
-------	-------------

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000170565]

1. 変更新月日 1990年 8月21日

[変更理由] 新規登録

住 所 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

氏 名 国際試薬株式会社